

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :

C12N 15/52, 15/81, 1/19, C12P 5/02,
7/04, 7/02, 33/00

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/16886

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

8. April 1999 (08.04.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06134

(22) Internationales Anmeldedatum: 28. September 1998
(28.09.98)

(30) Prioritätsdaten:
197 44 212.9 30. September 1997 (30.09.97) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, Postfach 65 03 11, D-13342 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WEBER, Alfred [DE/DE]; Schützallee 56, D-14169 Berlin (DE). KLAGES, Uwe [DE/DE]; Schramberger Strasse 19, D-13467 Berlin (DE). KENNECKE, Mario [DE/DE]; Taubertstrasse 31 f, D-14193 Berlin (DE). LANG, Christine [DE/DE]; Goethestrasse 59, D-10625 Berlin (DE). STAHL, Ulf [DE/DE]; Mühlenfeldstrasse 115, D-13467 Berlin (DE). POLAKOWSKI, Thomas [DE/DE]; Egelsstrasse 2, D-13507 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING ERGOSTEROL AND INTERMEDIATE PRODUCTS THEREOF BY MEANS OF RECOMBINANT YEASTS

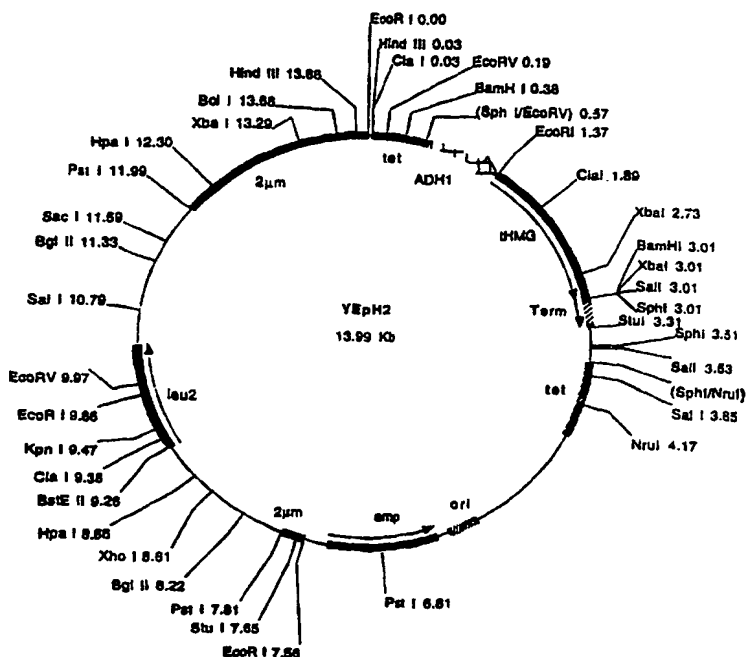
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON ERGOSTEROL UND DESSEN ZWISCHENPRODUKTEN MITTELS REKOMBINANTER HEFEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for producing ergosterol and intermediate products thereof by means of recombinant yeasts and plasmids for transforming yeasts.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten mittels rekombinanter Hefen und Plasmiden zur Transformation von Hefen beschrieben.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten mittels rekombinanter Hefen

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten mittels rekombinanter Hefen und Plasmide zur Transformation von Hefen.

Ergosterol ist das Endprodukt der Sterol-Synthese in Hefen und Pilzen. Die wirtschaftliche Bedeutung dieser Verbindung liegt zum einen in der Gewinnung
10 von Vitamin D₂ aus Ergosterol über UV-Bestrahlung, zum anderen in der Gewinnung von Steroidhormonen über Biotransformation, ausgehend von Ergosterol. Squalen wird als Synthesebaustein für die Synthese von Terpenen benutzt. In hydrierter Form findet es als Squalan Verwendung in Dermatologie und Kosmetik sowie in verschiedenen Derivaten als Inhaltsstoff von Haut- und
15 Haarpflegemitteln. Ebenso von wirtschaftlicher Bedeutung sind die Zwischenprodukte des Ergosterol-Stoffwechselweges. Als wichtigste seien hier Farnesol, Geraniol und Squalen genannt. Weiterhin wirtschaftlich nutzbar sind Sterole, wie z.B. Zymosterol und Lanosterol, wobei Lanosterol Roh- und Synthesepivotal für die chemische Synthese von Saponinen und
20 Steroidhormonen ist. Wegen seiner guten Hautpenetration und Spreadingeigenschaften dient Lanosterol als Emulsionshilfs- und Wirkstoff für Hautcremes.

Die Gene des Ergosterol-Stoffwechsels in Hefe sind weitgehend bekannt und
25 kloniert, so z.B. die HMG-CoA-Reduktase (*HMG1*) (Basson et al. (1988)), die Squalensynthetase (*ERG 9*) (Fegueur et al. (1991)), die Acyl-CoA: Sterol-Acyltransferase (*SAT1*) (Yu et al. (1996)) und die Squalenepoxidase (*ERG1*) (Jandrositz et al. (1991)). Squalensynthetase katalysiert die Reaktion von Farnesylpyrophosphat über Presqualenpyrophosphat zu Squalen. Die
30 Reaktionsmechanismen von Sterolacyltransferase sind nicht vollständig geklärt. Eine Überexpression der Gene dieser genannten Enzyme wurde bereits versucht, führte jedoch zu keiner nennenswerten Erhöhung der Ergosterol-Menge. Im Fall der *HMG1*-Überexpression wurde die Überproduktion von Squalen beschrieben, hierzu wurden zusätzlich Mutationen zur Unterbrechung
35 des nach Squalen folgenden Weges eingeführt (EP-0 486 290). Die Überproduktion von Geraniol und Farnesol wurde ebenfalls beschrieben, hier erfolgte allerdings keine Überexpression von Genen des Ergosterol-

Stoffwechsels, sondern eine Unterbrechung des Reaktionsweges in Richtung Geraniol- und Farnesol-Bildung (EP-0313 465).

Spezifische Inhibitoren der Ergosterolbiosynthese können ebenfalls zur Anhäufung größerer Mengen bestimmter Zwischenprodukte führen, z.B.

- 5 Allylamine, die die Umwandlung von Squalen zu Squalenepoxid verhindern. Dadurch werden große Mengen (bis zum 600fachen des Normallevels) Squalen angehäuft (Jandrositz et al., (1991)).

- 10 Zwar wurden durch die Verwendung von Inhibitoren eine große Anhäufung von z.B. Squalen erreicht, doch dürfte sich die Zugabe dieser Substanzen als nachteilig erweisen, da selbst geringe Mengen die gleiche Wirkung im Organismus entfalten, so daß eine Herstellung von Produkten der Ergosterolbiosynthese auf dem Weg der Überproduktion von Vorteil ist.

- 15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten, die hierfür notwendigen Mikroorganismen wie Hefestämme, die erhöhte Mengen an Ergosterol bzw. hierfür notwendige Zwischenprodukte zu synthetisieren und die zur Transformation der Hefestämme notwendigen Plasmide bereitzustellen.

20

Es wurde nun gefunden, daß man die Menge an Ergosterol und dessen Zwischenprodukten steigern kann, wenn die Gene der *HMG1* (Basson et al., (1988)), *ERG9* (Fegueur et al., (1991)), *Current Genetics* 20: 365-372), *SAT1* (Yu et al., (1996)) und *ERG1* (Jandrositz et al. (1991)) in Mikroorganismen wie

25 z.B. Hefen in veränderter Form eingebracht werden, wobei die Gene entweder einzeln auf einem Plasmid oder in Kombination auf einem oder mehreren Plasmiden lokalisiert sind und gleichzeitig oder nacheinander in den Wirt gebracht werden können.

- 30 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren, das dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem mehrere geeignete Gene des Ergosterol-Stoffwechselweges in veränderter Form
- 35 insertiert sind
- oder

- b) zunächst Plasmide konstruiert, auf denen jeweils eines der Gene des Ergosterol-Stoffwechselweges in veränderter Form insertiert ist,
- 5 c) mit den so hergestellten Plasmiden Mikroorganismen transformiert, wobei die Mikroorganismen mit einem Plasmid unter a) transformiert werden oder mit mehreren Plasmiden unter b) gleichzeitig oder nacheinander transformiert werden,
- d) mit den so hergestellten Mikroorganismen eine Fermentation zu Ergosterol durchführt,
- 10 e) nach erfolgter Fermentation das Ergosterol und dessen Zwischenprodukte aus den Zellen extrahiert und analysiert und schließlich
- f) das so erhaltenen Ergosterol und dessen Zwischenprodukte mittels Säulenchromatographie reinigt und isoliert.
- 15

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist insbesondere ein Verfahren, das dadurch gekennzeichnet, daß man

- 20 a-i) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:
- i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*),
- ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*)
- iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*)
- und
- 25 iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG 1*),
- oder
- a-ii) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:
- i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*)
- 30 und
- ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*),
- oder
- a-iii) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:
- 35 i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*)
- und
- iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*),
- oder

- a-iv) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:
i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*)
und
5 iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*),
oder
a-v) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:
ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*)
10 und
iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*)
oder
a-vi) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:
15 ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*)
und
iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*),
oder
a-vii) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:
20 iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*)
und
iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*),
oder
25 b) zunächst Plasmide konstruiert, auf denen jeweils eines der unter a-i) genannten Gene insertiert ist,
und
c) mit den so hergestellten Plasmiden Mikroorganismen transformiert, wobei die Mikroorganismen mit einem Plasmid unter a-i) bis a-vii) transformiert werden oder mit mehreren Plasmiden unter b) gleichzeitig oder nacheinander transformiert werden,
30 d) mit den so hergestellten Mikroorganismen eine Fermentation zu Ergosterol durchführt,
e) nach erfolgter Fermentation das Ergosterol und dessen Zwischenprodukte aus den Zellen extrahiert und analysiert und schließlich
35 f) das so erhaltenen Ergosterol und dessen Zwischenprodukte mittels Säulenchromatographie reinigt und isoliert.

Auf den unter a-ii), a-iii) und a-v) aufgeführten Plasmiden kann zusätzlich das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*) und auf dem unter a-ii) aufgeführten Plasmid kann zusätzlich das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*) insertiert sein. Diese Plasmide sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden
5 Erfindung.

Unter Zwischenprodukten sind Squalen, Farnesol, Geraniol, Lanosterol, Zymosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, 4-Methylzymosterol, Ergost-7-enol und Ergosta-5,7-dienol, insbesondere Sterole mit 5,7-Dienstruktur, zu verstehen.
10

Die verwendeten Plasmide sind vorzugsweise das Plasmid YEpH2, das den mittleren *ADH*-Promotor, t-HMG (veränderte Variante des *HMG1*) und den *TRP*-Terminator (s. Fig. 1) enthält, das Plasmid YDpUHK3, das den mittleren *ADH*-Promotor, t-HMG (veränderte Variante des *HMG1*) und den *TRP*-Terminator,
15 das Gen für die Kanamycin-Resistenz und das *ura3* Gen enthält (s. Fig. 2) und das Plasmid pADL-SAT1, das das *SAT1*-Gen und das *LEU2*-Gen aus YEp13 enthält.

Diese Plasmide und deren Verwendung zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten wie Squalen, Farnesol, Geraniol, Lanosterol, Zymosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, 4-Methylzymosterol, Ergost-7-enol und Ergosta-5,7-dienol, insbesondere Sterole mit 5,7-Dienstruktur, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.
20

Als Wirt für die Einführung der erfindungsgemäßen Plasmide kommen im Prinzip alle Mikroorganismen, insbesondere Hefen in Frage.
25

Bevorzugt ist die Spezies *S. cerevisiae*, insbesondere der Stamm *S. cerevisiae* AH22.
30

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch der Hefestamm *S. cerevisiae* AH22, der eines oder mehrerer der im Verfahren unter a-i) genannten Gene enthält.

Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist der Hefestamm *S. cerevisiae* AH22, der das Plasmid pADL-SAT1 enthält.
35

Weiterhin bevorzugt ist die kombinierte Transformation von Mikroorganismen mit den Plasmiden pADL-SAT1 und YDpUHK3, insbesondere Hefen wie *S. cerevisiae* AH22.

5 Insgesamt gesehen wird der Fluß im Ergosterol-Stoffwechselweg wie folgt beeinflusst:

Der Fluß in Richtung Ergosterol wird maximiert, indem die Aktivität von mehreren Flaschenhals-Enzymen gleichzeitig verstärkt wird. Dabei spielen verschiedene Enzyme eine entscheidende Rolle, wobei die Kombination von Deregulation bzw. Überexpression den entscheidenden Durchbruch zur
10 Ergosterolausbeutesteigerung bringt. Als Kombination werden die Enzyme bzw. deren Gene *HMG1* (Basson et al., (1988)), *ERG9* (Fegueur et al., (1991)), Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*) (Yu et al. (1996)) und/ oder Squalenepoxidase (*ERG1*) (Jandrositz et al. (1991)) in einen Hefestamm in
15 *veränderter* Form eingebracht, wobei das Einbringen der Gene mit einem oder mehrerer Plasmide erfolgt, wobei auf dem (den) Plasmid(en) die DNA-Sequenzen entweder einzeln oder in Kombination enthalten sind.

"Verändert" bedeutet im Falle des Gens *HMG1*, daß von dem entsprechenden Gen nur der katalytische Bereich ohne die membrangebundene Domäne exprimiert wird. Diese Veränderung wurde bereits beschrieben (EP-0486 290).
20 Ziel der Veränderung von *HMG1* ist es, die Feed-back-Regulation durch Intermediate der Ergosterolbiosynthese zu verhindern. Sowohl *HMG1* als auch die beiden anderen genannten Gene werden so auf gleiche Weise der transkriptionellen Regulation entzogen. Dazu wird der Promotor der Gene durch den "mittleren" *ADH1*-Promotor ersetzt. Dieses Promotorfragment des *ADH1*-
25 Promotors zeigt eine annähernd konstitutive Expression (Ruohonen et al., (1995)), so daß die transkriptionelle Regulation nicht mehr über Intermediate der Ergosterolbiosynthese abläuft.

Die bei der Überexpression entstehenden Produkte können in Biotransformationen bzw. anderen chemischen und therapeutischen Zwecken
30 verwandt werden, z.B. die Gewinnung von Vitamin D₂ aus Ergosterol über UV-Bestrahlung, und die Gewinnung von Steroidhormonen über Biotransformation ausgehend von Ergosterol.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Mikroorganismen,
35 insbesondere Hefestämme, die durch Überexpression der im Verfahren unter a-i) genannten Gene eine erhöhte Menge an Ergosterol und Ergosterol in Kombination mit erhöhten Mengen an Squalen herstellen können.

Bevorzugt ist eine veränderte Variante des Gens *HMG1*, in dem nur der katalytische Bereich ohne die membrangebundene Domäne exprimiert wird. Diese Veränderung ist beschrieben (EP-0486 290).

- 5 Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man die im Verfahren unter a), insbesondere die im Verfahren unter a-i) bis a-vii) genannten Gene (zwei-, drei-, vierfache Gen-Kombination) mit den Plasmiden zunächst jeweils unabhängig voneinander in
- 10 Mikroorganismen gleicher Spezies einführt und mit diesen gemeinsam eine Fermentation zu Ergosterol durchführt und das so erhaltene Ergosterol aus den Zellen extrahiert, analysiert und mittels Säulenchromatographie reinigt und isoliert.
- 15 Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Expressionskassetten, umfassend den mittleren *ADH*-Promotor, das *t-HMG*-Gen, den *TRP*-Terminator und das *SAT1*-Gen mit dem mittleren *ADH*-Promotor und dem *TRP*-Terminator und Expressionskassetten, umfassend den mittleren *ADH*-Promotor, das *t-HMG*-Gen, den *TRP*-Terminator, das *SAT1*-Gen mit dem mittleren *ADH*-
- 20 Promotor und dem *TRP*-Terminator und das *ERG9*-Gen mit dem mittleren *ADH*-Promotor und dem *TRP*-Terminator.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch eine Kombination aus Expressionskassetten, wobei die Kombination aus

- 25
- a) einer ersten Expressionskassette, auf der der *ADH*-Promotor, das *t-HMG*-Gen und der *TRP*-Terminator lokalisiert ist,
 - b) einer zweiten Expressionskassette, auf der der *ADH*-Promotor, das *SAT1*-Gen und der *TRP*-Terminator lokalisiert ist,
- 30 und
- c) einer dritten Expressionskassette, auf der der *ADH*-Promotor, das *ERG9*-Gen mit dem *TRP*-Terminator lokalisiert ist,

besteht.

- 35 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Verwendung dieser Expressionskassetten zur Transformation von Mikroorganismen, die bei der Fermentation zu Ergosterol eingesetzt werden, wobei die Mikroorganismen vorzugsweise Hefen sind.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind Mikroorganismen, wie Hefen, die diese Expressionskassetten enthalten, sowie deren Verwendung bei der Fermentation zu Ergosterol und Ergosterol-Zwischenprodukten.

5

10

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Erläuterung im Hinblick auf die Durchführung der für die Ausführungsbeispiele notwendigen Verfahren:

1. Restriktion

5

Die Restriktion der Plasmide (1 bis 10 µg) wurde in 30 µl Ansätzen durchgeführt. Dazu wurde die DNA in 24 µl H₂O aufgenommen, mit 3 µl des entsprechenden Puffers, 1 µl RSA (Rinderserumalbumin) und 2 µl Enzym versetzt. Die Enzymkonzentration betrug 1 Unit/µl oder 5 Units/µl je nach DNA-Menge. In einigen Fällen wurde dem Ansatz noch 1 µl RNase zugegeben, um die tRNA abzubauen. Der Restriktionsansatz wurde für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Kontrolliert wurde die Restriktion mit einem Minigel.

2. Gelelektrophoresen

15

Die Gelelektrophoresen wurden in Minigel- oder Wide-Minigelapparaturen durchgeführt. Die Minigele (ca. 20 ml, 8 Taschen) und die Wide-Minigele (50 ml, 15 oder 30 Taschen) bestanden aus 1%iger Agarose in TAE. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Die Proben (10 µl) wurden mit 3 µl Stopperlösung versetzt und aufgetragen. Als Standard diente I-DNA geschnitten mit *HindIII* (Banden bei: 23,1 kb; 9,4 kb; 6,6 kb; 4,4 kb; 2,3 kb; 2,0 kb; 0,6 kb). Zur Auftrennung wurde eine Spannung von 80 V für 45 bis 60 min angelegt. Danach wurde das Gel in Ethidiumbromidlösung angefärbt und unter UV-Licht mit dem Video-Dokumentationssystem INTAS festgehalten oder mit einem Orange-Filter fotografiert.

25

3. Gelelution

30

Mittels Gelelution wurden die gewünschten Fragmente isoliert. Der Restriktionsansatz wurde auf mehrere Taschen eines Minigels aufgetragen und aufgetrennt. Nur λ -*HindIII* und eine "Opferspur" wurden in Ethidiumbromidlösung angefärbt, unter UV-Licht betrachtet und das gewünschte Fragment markiert. Dadurch wurde verhindert, daß die DNA der restlichen Taschen durch das Ethidiumbromid und das UV-Licht geschädigt wird. Durch Aneinanderlegen des gefärbten und ungefärbten Gelstücks konnte anhand der Markierung das gewünschte Fragment aus dem ungefärbten Gelstück

35

herausgeschnitten werden. Das Agarosestück mit dem zu isolierenden Fragment wurde in einen Dialyseschlauch gegeben, mit wenig TAE-Puffer luftblasenfrei verschlossen und in die BioRad-Minigelapparatur gelegt. Der Laufpuffer bestand aus 1 x TAE und die Spannung betrug 100 V für 40 min.

- 5 Danach wurde für 2 min die Strompolarität gewechselt, um am Dialyseschlauch klebende DNA wieder zu lösen. Der die DNA-Fragmente enthaltende Puffer des Dialyseschlauches wurde in Reaktionsgefäße überführt und damit eine Ethanol-Fällung durchgeführt. Dazu wurde der DNA-Lösung 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat, tRNA (1 µl pro 50 µl Lösung) und dem 2,5 fachen Volumen an
10 eiskaltem 96%igem Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei -20 °C inkubiert und dann bei 12000 rpm, 30 min, 4 °C abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 10 bis 50 µl H₂O (je nach DNA-Menge) aufgenommen.

15 4. Klenow-Behandlung

Durch die Klenow-Behandlung werden überstehende Enden von DNA-Fragmenten aufgefüllt, so daß "blunt-ends" entstehen. Pro 1 µg DNA wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert:

20

DNA-Pellet	+ 11 µl	H ₂ O
	+ 1,5 µl	10 x Klenow Puffer
	+ 1 µl	0,1 M DTT
	+ 1 µl	Nucleotide (dNTP 2 mM)
25	+ 1 µl	Klenow-Polymerase (1Unit/µl)

25

Die DNA sollte dabei aus einer Ethanolfällung stammen, um zu verhindern, daß Verunreinigungen die Klenow-Polymerase hemmen. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C, durch weitere 5 min bei 70 °C wurde die Reaktion abgestoppt.
30 Die DNA wurde aus dem Ansatz durch eine Ethanolfällung gewonnen und in 10 µl H₂O aufgenommen.

5. Ligation

35

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden vereinigt. Das Endvolumen von 13,1 µl enthielt ca. 0,5 µg DNA mit einem Vektor-Insert Verhältnis von 1:5. Die Probe wurde 45 Sekunden bei 70 °C inkubiert, auf Raumtemperatur abgekühlt (ca. 3

min) und dann 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Ligationspuffer zugegeben: 2,6 µl 500 mM TrisHCl pH 7,5 und 1,3 µl 100 mM MgCl₂ und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl 500 mM DTT und 1 µl 10 mM ATP und nochmaligen 10 min auf Eis wurde 1 µl Ligase (1Unit/µl) zugegeben. Die ganze Behandlung sollte möglichst erschütterungsfrei erfolgen, um aneinanderliegende DNA-Enden nicht wieder zu trennen. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14 °C.

10 6. *E. coli*-Transformation

Kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) NM522 Zellen wurden mit der DNA des Ligationsansatzes transformiert. Als Positiv-Kontrolle lief ein Ansatz mit 50 ng des pScL3 Plasmids und als Null-Kontrolle ein Ansatz ohne DNA mit. Für jeden Transformationsansatz wurden 100 µl 8% PEG-Lösung, 10 µl DNA und 200 µl kompetente Zellen (*E. coli* NM522) in ein Tischzentrifugenröhrchen pipettiert. Die Ansätze wurden für 30 min in Eis gestellt und gelegentlich geschüttelt. Danach erfolgte der Hitzeschock: 1 min bei 42 °C. Für die Regeneration wurde den Zellen 1 ml LB-Medium zugegeben und für 90 min bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Je 100 µl der unverdünnten Ansätze, einer 1:10 Verdünnung und einer 1:100 Verdünnung wurden auf LB + Ampicillin-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

25

7. Plasmid-Isolation aus *E. coli* (Minipräp)

E. coli -Kolonien wurden über Nacht in 1,5 ml LB + Ampicillin-Medium in Tischzentrifugenröhrchen bei 37 °C und 120 rpm angezogen. Am nächsten Tag wurden die Zellen 5 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Jeder Ansatz wurden mit 100 µl 0,2 N NaOH, 1% SDS-Lösung versetzt, gemischt und für 5 min auf Eis gestellt (Lyse der Zellen). Danach wurden 400 µl Na-Acetat/NaCl-Lösung (230 µl H₂O, 130 µl 3 M Natriumacetat, 40 µl 5 M NaCl) zugegeben, der Ansatz gemischt und für weitere 15 min auf Eis gestellt (Proteinfällung). Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 11000 rpm wurde der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, in ein Eppendorfgefäß überführt. War der Überstand nicht vollständig klar, wurde nochmal zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 360 µl eisgekühltem

Isopropanol versetzt und für 30 min bei -20 °C inkubiert (DNA-Fällung). Die DNA wurde abzentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4 °C), der Überstand verworfen, das Pellet in 100 µl eisgekühltem 96%igem Ethanol gewaschen, 15 min bei -20 °C inkubiert und erneut abzentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde
5 im Speed Vac getrocknet und dann in 100 µl H₂O aufgenommen. Die Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsanalyse charakterisiert. Dazu wurden 10 µl jedes Ansatzes restringiert und in einem Wide-Minigel gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe oben).

10

8. Plasmid-Aufarbeitung aus *E. coli* (Maxipräp)

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren, wurde die Maxipräp-Methode durchgeführt. Zwei Kolben mit 100 ml LB + Ampicillin-Medium wurden
15 mit einer Kolonie bzw. mit 100 µl einer Gefrierkultur, die das zu isolierende Plasmid trägt, angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 120 rpm bebrütet. Die Anzucht (200 ml) wurde am nächsten Tag in einen GSA-Becher überführt und bei 4000 rpm (2600 x g) 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 6 ml TE-Puffer aufgenommen. Zum Abbau der Zellwand wurden 1,2 ml Lysozymlösung
20 (20 mg/ml TE-Puffer) zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen mit 12 ml 0,2 N NaOH, 1% SDS-Lösung und weiteren 5 min Inkubation bei Raumtemperatur. Die Proteine wurden durch die Zugabe von 9 ml gekühlter 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und einer 15 minütigen Inkubation auf Eis gefällt. Nach der Zentrifugation
25 (GSA: 13000 rpm (27500 x g), 20 min, 4 °C) wurde der Überstand, der die DNA enthielt, in einen neuen GSA-Becher überführt und die DNA mit 15 ml eiskaltem Isopropanol und einer Inkubation von 30 min bei -20 °C gefällt. Das DNA-Pellet wurde in 5 ml eisgekühltem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet (ca. 30 - 60 min). Danach wurde es in 1 ml H₂O aufgenommen. Es fand eine
30 Überprüfung des Plasmids durch Restriktionsanalyse statt. Die Konzentration wurde durch Auftragen von Verdünnungen auf einem Minigel bestimmt. Zur Verringerung des Salzgehaltes erfolgte eine 30 - 60 minütige Mikrodialyse (Porengröße 0,025-µm).

35

9. Hefe-Transformation

Für die Hefe-Transformation wurde eine Voranzucht des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) AH22 angesetzt. Ein Kolben mit 20 ml YE-Medium wurde mit 100 µl der Gefrierkultur angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 120 rpm bebrütet. Die Hauptanzucht erfolgte unter gleichen Bedingungen in Kolben mit 100 ml YE-Medium, die mit 10 µl, 20 µl oder 50 µl der Voranzucht angeimpft wurden.

9.1 Erstellen kompetenter Zellen

Am nächsten Tag wurden die Kolben mittels Thomakammer ausgezählt und es wurde mit dem Kolben, der eine Zellzahl von $3 - 5 \times 10^7$ Zellen/ml besaß weitergearbeitet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (GSA: 5000 rpm (4000 x g), 10 min) geerntet. Das Zellpellet wurde in 10 ml TE-Puffer aufgenommen und auf zwei Tischzentrifugenröhrchen aufgeteilt (je 5 ml). Die Zellen wurden 3 min bei 6000 rpm abzentrifugiert und noch zweimal mit je 5 ml TE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 330 µl Lithiumacetat-Puffer pro 10^9 Zellen aufgenommen, in einen sterilen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und eine Stunde bei 28 °C geschüttelt. Dadurch waren die Zellen kompetent für die Transformation.

9.2 Transformation

Für jeden Transformationsansatz wurden 15 µl Heringssperma DNA (10 mg/ml), 10 µl zu transformierende DNA (ca. 0,5 µg) und 330 µl kompetente Zellen in ein Tischzentrifugenröhrchen pipettiert und 30 min bei 28 °C (ohne Schütteln!) inkubiert. Danach wurden 700 µl 50% PEG 6000 zugegeben und für eine weitere Stunde bei 28 °C, ohne Schütteln, inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 5 min bei 42 °C.

100 µl der Suspension wurden auf Selektionsmedium (YNB, Difco) ausplattiert, um auf Leucinprototrophie zu selektionieren. Im Falle der Selektion auf G418 Resistenz wird nach dem Hitzeschock eine Regeneration der Zellen durchgeführt (s. unter 9.3 Regenerationsphase)

9.3 Regenerationsphase

Da der Selektionsmarker die Resistenz gegen G418 ist, brauchten die Zellen Zeit für die Expression des Resistenz-Gens. Die Transformationsansätze wurden mit 4 ml YE-Medium versetzt und über Nacht bei 28 °C auf dem Schüttler (120 rpm) bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert (6000 rpm, 3 min) in 1 ml YE-Medium aufgenommen und davon 100 µl bzw. 200 µl auf YE + G418-Platten ausplattiert. Die Platten wurden mehrere Tage bei 28 °C bebrütet.

10. Reaktionsbedingungen für die PCR

Die Reaktionsbedingungen für die Polymerase Chain Reaction müssen für den Einzelfall optimiert werden und sind nicht uneingeschränkt für jeden Ansatz gültig. So kann unter anderem die eingesetzte Menge an DNA, die Salzkonzentrationen und die Schmelztemperatur variiert werden. Für unsere Problemstellung erwies es sich als günstig, in einem Eppendorfhütchen, das für den Einsatz im Thermocycler geeignet war, folgende Substanzen zu vereinigen: Zu 2 µl (~0,1 U) Super Taq Polymerase wurden 5 µl Super Buffer, 8 µl dNTP's (je 0,625 µM), 5'-Primer, 3'-Primer und 0,2 µg Matritzen DNA, gelöst in soviel Wasser, daß sich ein Gesamtvolumen von 50 µl für den PCR Ansatz ergibt, zugegeben. Der Ansatz wurde kurz abzentrifugiert und mit einem Tropfen Öl überschichtet. Es wurden zwischen 37 und 40 Zyklen zur Amplifizierung gewählt.

Die nachfolgenden Ausführungsbeispiele beschreiben die Herstellung der erfindungsgemäßen Plasmide und Hefestämme sowie deren Verwendung, ohne jedoch die Erfindung auf diese Beispiele einzuschränken.

5 Beispiel 1

Expression der *tHMG* in *S. cerevisiae* AH22

Die DNA-Sequenz für *tHMG* (Basson et al., (1988)) wurde durch PCR aus genomischer DNA von *Saccharomyces cerevisiae* S288C (Mortimer und Johnston, (1986)) unter Anwendung von Standardmethoden amplifiziert. Die
10 hierbei verwendeten Primer sind die DNA Oligomere *tHMG*-5' und *tHMG*-3' (s. Seq ID Nos. 1 und 2). Das erhaltene DNA-Fragment wurde nach einer Klenow-Behandlung in den Klonierungsvektor pUC19 (Yanisch-Perron et al., (1985)) eingebracht und ergab den Vektor pUC19-*tHMG*. Nach Plasmidisolation und Restriktion von pUC19-*tHMG* mit den Endonukleasen *Eco*RI und *Bam*HI wurde
15 das gewonnene Fragment in den Hefeexpressionsvektor pPT2b (Lang und Looman, (1995)), der ebenfalls mit *Eco*RI und *Bam*HI behandelt wurde, eingebracht. Das entstandene Plasmid pPT2b-*tHMG* enthält den *ADH1*-Promotor (Bennetzen und Hall, (1982)) und den *TRP1*-Terminator (Tschumper und Carbon, (1980)), zwischen denen sich das *tHMG*-DNA-Fragment befindet.
20 Aus dem Vektor pPT2b-*tHMG* wurde über die Endonucleasen *Eco*RV und *Nru*I ein DNA-Abschnitt isoliert, die den sogenannten mittleren *ADH1*-Promotor, die *tHMG* und dem *TRP1*-Terminator enthält. Dieser DNA-Abschnitt wurde in den Hefe-Vektor YEpl3 (Fischhoff et al., (1984)), der mit der Endonuklease *Sph*I und einer DNA-Polymerase behandelt wurde, eingebracht. Der dadurch
25 entstandene Vektor, der YEplH2 (Fig. 1), wurde mit den Endonukleasen *Eco*RV und *Nru*I behandelt. Es entstand so ein DNA-Fragment mit folgenden Bereichen: ein transkriptionsaktivierender Bereich aus dem Tetracyclinresistenzgen (Sidhu und Bollon, (1990)), dem mittleren *ADH1*-Promotor, der *tHMG* und dem *TRP1*-Terminator (Expressionskassette). Dieses
30 DNA-Fragment wurde in den Vektor YDpU (Berben et al., (1991)), der mit *Stu*I behandelt wurde, eingebracht. Der so entstandene Vektor YDpUH2/12 wurde mit der Endonuklease *Sma*I behandelt und mit einer DNA-Sequenz ligiert, die für eine Kanamycinresistenz kodiert (Webster und Dickson, (1983)). Das entstandene Konstrukt (YDpUHK3, Fig. 2) wurde mit *Eco*RV behandelt. Der
35 Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* AH22 wurde mit diesem Konstrukt transformiert. Die Transformation der Hefe mit einem linearisierten Vektor, wie er in

- diesem Beispiel vorliegt, führt zu einer chromosomalen Integration des gesamten Vektors am *URA3* Genlocus. Um die Bereiche aus dem integrierten Vektor zu eliminieren, die nicht zu der Expressionskassette gehören (*E.coli*-origin, *E.coli*-Ampicillin-Resistenzgen, TEF-Promotor und Kanamycin-Resistenzgen), wurden transformierte Hefen mittels FOA-Selektion (Boeke et al., (1987)) einem Selektionsdruck unterzogen, der Uracil-auxotrophe Hefen begünstigt. Der aus der Selektion hervorgegangene, Uracil-auxotrophe Stamm trägt die Bezeichnung AH22/tH3ura8 und besitzt die *tHMG1*-Expressionskassette als chromosomale Integration im *URA3*-Gen.
- 10 Der Hefestamm AH22/tH3ura8 und der Ausgangsstamm AH22 wurden 48 Stunden lang in YE bei 28°C und 160 rpm in Schikanekolben kultiviert.

- Kultivierungsbedingungen: Die Vorkultur WMVIII wurde wie folgt angesetzt: 20 ml WMVIII + Histidin (20 µg/ml) + Uracil (20 µg/ml) wurden mit 100 µl Gefrierkultur angeimpft und 2 Tage bei 28°C und 120 rpm (reziprok) inkubiert.
- 15 Aus der 20 ml Vorkultur wurden 100 ml WMVIII + Histidin (20 µg/ml) + Uracil (20 µg/ml) angeimpft. Für die Hauptkultur wurden 50 ml YE (in 250 ml Schikanekolben) mit 1×10^9 Zellen beimpft. Die Kolben wurden bei 160 rpm auf einem Rundschüttler bei 28°C für 48 Stunden inkubiert. HMG-CoA-Reduktaseaktivitäten wurden (nach Qureshi et al., (1981)) bestimmt und ergaben
- 20 folgenden Werte (s. Tabelle 1).

Tabelle 1

	spezifische HMG-CoA-Reduktase-Aktivität* (U/mg Protein)
AH22	3,99
AH22/tH3ura8	11,12

- 25 *Ein Unit ist definiert als die Umsetzung von 1nmol NADPH pro Minute in einem Milliliter Reaktionsgemisch. Die Messung erfolgte mit Gesamtproteinisolaten.

Die Sterole wurden extrahiert (Parks et al., (1985)) und über Gaschromatographie analysiert. Es ergaben sich folgende Werte (s. Tabelle 2).

Tabelle 2

	Squalen (% w/w)	Ergosterol (% w/w)
AH22	0,01794	1,639
AH22/tH3ura8	0,8361	1,7024

Die prozentualen Werte beziehen sich auf das Hefetrockengewicht.

5 Beispiel 2

Expression der *SAT1* in *S. cerevisiae* AH22

Die Sequenz für die Acyl-CoA:Steroltransferase (*SAT1*; Yang et al., (1996)) wurde, wie oben beschrieben, durch PCR aus genomischer DNA von *Saccharomyces cerevisiae* S288C gewonnen. Die hierbei verwendeten Primer sind die DNA-Oligomere SAT1-5' und SAT1-3' (s. Seq ID Nos. 3 und 4). Das
 10 erhaltene DNA-Fragment wurde in den Klonierungsvektor pGEM-T (Mezei und Storts, (1994)) kloniert, was zum Vektor pGEM-SAT1 führte. Durch Behandlung von pGEM-SAT1 mit *EcoRI* erhielt man ein Fragment, das in den Hefeexpressionsvektor pADH1001, der ebenfalls mit *EcoRI* behandelt wurde,
 15 kloniert wurde. Der so entstandene Vektor pADH-SAT1 wurde mit der Endonuklease *NruI* behandelt und mit einem Fragment aus YEp13, der das *LEU2*-Gen enthält, ligiert.

So entstand der Hefeexpressionsvektor pADL-SAT1 (Fig. 3), der in den Hefestamm AH22 eingebracht wurde. Der so gewonnene Stamm AH22/pADL-SAT1 wurde 7 Tage in WMVIII (Lang und Looman (1995)) Minimalmedium
 20 inkubiert. Kultivierungsbedingungen: (Zur Vorkultur s.o.) Hauptkultur: 50 ml WMVIII + Histidin (20µg/ml) + Uracil (20 µg/ml) Kulturen (in 250 ml Schikanekolben) wurden mit 1×10^9 Zellen beimpft: Die Kolben wurden bei 160 rpm auf einem Rundschtüttler bei 28°C für 7 Tage inkubiert. Die
 25 gebildeten Sterole wurden über Gaschromatographie analysiert (s. Tabelle 3).

Tabelle 3

	Squalen (% w/w)	Ergosterol (% w/w)
AH22	n.d.	1,254
AH22/ pADL-SAT1	n.d.	1,831

Die prozentualen Werte beziehen sich auf das Hefetrockengewicht.
n.d.: nicht bestimmbar

Beispiel 3

Kombinierte Expression der verkürzten 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase (*tHMG*) und der Acyl-CoA: Sterol-Acyltransferase (*SAT1*)

Beispiel 3.1

Der Hefestamm AH22/tH3ura8 wurde mit dem *SAT1*-Expressionsvektor pADL-SAT1 transformiert und ergab AH22/tH3ura8/pADL-SAT1. Dieser kombinierte Stamm wurde 7 Tage in WMVIII kultiviert. Die Sterole wurden extrahiert (s.o.) und über Gaschromatographie analysiert. Es ergaben sich folgende Werte (s. Tabelle 4).

Tabelle 4

	Squalen (% w/w)	Ergosterol (% w/w)
AH22/tH3ura8	1,602	3,798
AH22/tH3ura8/pADL-SAT1	1,049	5,540

Die prozentualen Werte beziehen sich auf das Hefetrockengewicht.

Beispiel 3.2

Hefekulturen wurden 7 Tage in WMVIII kultiviert, jedoch wurden verschiedene
5 Mengen Uracil zu den Kulturen gegeben. Es wurden Konzentrationen von 10,
20, 40 und 100 µg/ml Uracil im Medium eingestellt. Die Ergosterol und die
Squalenmengen sind bei einer Supplementation von 20 µg/ml Uracil maximal.
Die Ergebnisse sind in der Fig. 4 dargestellt.

10 Es ist zu erkennen, daß die Ergosterol- und Squalenausbeute im Stamm
AH22tH3ura8/pADL-SAT1 stark von der ins Kultivierungsmedium WMVIII
zugegebenen Uracilmenge abhängig ist.

Beispiel 3.3

Hefekulturen wurden 7 Tage in WMVIII kultiviert. Anschließend wurde die
Gesamtheit der Sterole wie oben beschrieben bestimmt. Die freien Sterole
werden aus mit Glasperlen aufgeschlossenen und mit n-Hexan extrahierten
20 Hefen über GC bestimmt

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 dargestellt.

Aus den Ergebnissen ist zu erkennen, daß das Enzym Sterol-Acyl Transferase
25 (Sat1) mit hoher Effektivität vornehmlich Sterole verestert, denen die 4,4-
Dimethylgruppe fehlt. Damit kommt auch eine technische Anwendung für die
Trennung von 4,4-Dimethylsterolen von den entsprechend demethylierten
Formen in Betracht.

30

Tabelle 5

Prozentualer Anteil freier Sterole. Jedes Sterol wurde als freies Sterol (ohne
Verseifung) bestimmt und auf die Gesamtmenge dieses Sterols bezogen. In
35 Klammern sind dazu die absoluten Gesamtsterolgehalte als Area/g
Trockensubstanz angegeben. Lanosterol und 4,4-Dimethylzymosterol sind
Sterole mit 4,4-Dimethylgruppe.

	% freie Sterole			
	Kontrolle		AH22tH3ura8/pADL-SAT1	
Lanosterol	54	(0,99)	59	(2,90)
4,4-Dimethylzymosterol	58	(0,77)	84	(2,37)
4-Methylzymosterol	7	(2,43)	10	(7,62)
Zymosterol	10	(1,67)	11	(5,85)
Ergost-7-enol,	24	(4,55)	12	(9,00)
Ergosta-5,7-dienol				

Beschreibung der Abbildungen

5

Fig. 1 zeigt das Plasmid YEpH2 mit den entsprechenden Schnittstellen.

Fig. 2 zeigt das Plasmid YDpUHK3 mit den entsprechenden Schnittstellen.

Fig. 3 zeigt das Plasmid pADL-SAT1 mit den entsprechenden Schnittstellen.

Fig. 4 zeigt das Wachstumsverhalten und Ergosterol- und Squalengehalte bei unterschiedlicher Uracilsupplementation. In der Abbildung bedeuten: OD = optische Dichte, cultivation time = Kultivierungszeit, yeast dry weight = Hefe-Trockengewicht, uracil supplementation = Uracilsupplementation.

15

Literaturzitate

- 5 Basson, M.E., Thorsness, M., Finer-Moore, J., Stroud, R.M., Rine, J. (1988) Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis. *Mol. Cell. Biol.* 8: 3793-3808.
- 10 Bennetzen, J. L., Hall, B. D. (1982) The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 257: 3018-3025.
- 15 Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V., Bolle, P. A., Hilger, F. (1991) The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7: 475-477.
- 20 Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., Fink, G. (1987) 5-Fluorootic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in Enzymology* 154: 164-175.
- 25 Fegueur, M., Richard, L., Charles, A.D., Karst, F. (1991) Isolation and primary structure of the ERG9 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding squalene synthetase. *Current Genetics* 20: 365-372.
- 30 Fischhoff, D. A., Waterston, R. H., Olson, M. V. (1984) The yeast cloning vector YEp13 contains a tRNA^{Leu3} gene that can mutate to an amber suppressor. *Gene* 27: 239-251.
- 35 Jandrositz, A., Turnowsky, F., Högenauer, G. (1991) The gene encoding squalen epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. *Gene* 107: 155-160.
- 40 Mezei, L. M., Storts, D. R. (1994) in: PCR technology: current innovations, Griffin, H. G. and Griffin, A. M., eds. CRC Press, Boca Raton, 21.
- 45 Mortimer, R. K., Johnston, J. R. (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* 113: 35-43.
- Lang C., Looman A.C. (1995) Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 147-156.
- Parks LW, Bottema CDK, Rodriguez RJ, Lewis TA (1985) Yeast sterols: yeast mutants as tools for the study of sterol metabolism. *Meth. Enzymol.* 111: 333-346.
- Qureshi, N., Nimmannit, S., Porter, J. W. (1981) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from Yeast. *Meth. Enzymol.* 71: 455-461.

Ruohonen, L., Aalto, M.K., Keranen, S. (1995) Modifications to the ADH1 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of heterologous proteins. *Journal of Biotechnology* 39: 193-203.

- 5 Siduh, R. S., Bollon, A. P. (1990) Bacterial plasmid pBR322 sequences serve as upstream activating sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6: 221-229.

Tschumper, G., Carbon, J. (1980) Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the *TRP1* gene. *Gene* 10: 157-166.

10

Webster, T. D., Dickson, R. C. (1983) Direct selection of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the antibiotic G418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin-resistance gene of Tn903. *Gene* 26: 243-252.

15

Yang, H., Bard, M., Bruner, D. A., Gleeson, A., Deckelbaum, R. J., Aljinovic, G., Pohl, T. M., Rothstein, R., Sturley, S. L. (1996) Sterol esterification in yeast: a two-gene process. *Science* 272: 1353-1356.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. *Gene* 33 (1985) 103-119.

20

Yu, C., Rothblatt, J.A. Cloning and characterisation of the *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA:sterol acyltransferase (1996), *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 24157-24163.

25

SEQUENCE LISTING

5 (1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

(A) NAME: Schering AG

- 10 (B) STREET: Müllerstrasse 178
(C) CITY: Berlin
(E) COUNTRY: Germany
(F) POSTAL CODE (ZIP): D-13342
(G) TELEPHONE: (030)-4681 2085
15 (H) TELEFAX: (030)-4681 2058

(ii) TITLE OF INVENTION: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON
ERGOSTEROL UND DESSEN ZWISCHENPRODUKTEN MITTELS
REKOMBINANTER HEFEN

20

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 4

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
25 (B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

30 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO. 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 25 bases
(B) TYPE: nucleic acid
35 (C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

-24-

(ii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

5'- ACTATGGACC AATTGGTGAA AACTG

5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO. 2:

10 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 23 bases

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

15

(ii) HYPOTHETICAL: NO

20 (iii) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 2:

5'- AGTCACATGG TGCTGTTGTG CTT

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO. 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 25 bases

30 (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

35 (ii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 3:

5'- GAATTCAACC ATGGACAAGA AGAAG

5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO. 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 10 (A) LENGTH: 24 bases
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

15

(ii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO. 4:

20

5'- AGAATTCCAC AGAACAGTTG CAGG

Patentanspruch

1. Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und dessen
5 Zwischenprodukten, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem mehrere geeignete Gene des Ergosterol-Stoffwechselweges in veränderter Form insertiert sind
 - 10 oder
 - b) zunächst Plasmide konstruiert, auf denen jeweils eines der Gene des Ergosterol-Stoffwechselweges in veränderter Form insertiert ist,
 - c) mit den so hergestellten Plasmiden Mikroorganismen transformiert,
15 wobei die Mikroorganismen mit einem Plasmid unter a) transformiert werden oder mit mehreren Plasmiden unter b) gleichzeitig oder nacheinander transformiert werden,
 - d) mit den so hergestellten Mikroorganismen eine Fermentation zu Ergosterol durchführt,
 - 20 e) nach erfolgter Fermentation das Ergosterol und dessen Zwischenprodukte aus den Zellen extrahiert und analysiert und schließlich
 - f) das so erhaltenen Ergosterol und dessen Zwischenprodukte mittels Säulenchromatographie reinigt und isoliert.
- 25 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a-i) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:
 - 30 i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*),
 - ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*)
 - iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*)
 - und
 - iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG 1*),
 - oder
 - 35 a-ii) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert sind:
 - i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*)
 - und

-27-

- ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*),
oder
a-iii) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert
sind:
5 i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*)
und
iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*),
oder
a-iv) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert
10 sind:
i) das Gen der HMG-Co-A-Reduktase (*t-HMG*)
und
iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*),
oder
15 a-v) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert
sind:
ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*)
und
iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*)
20 oder
a-vi) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert
sind:
ii) das Gen der Squalensynthetase (*ERG9*)
und
25 iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*),
oder
a-vii) zunächst ein Plasmid konstruiert, auf dem folgende Gene insertiert
sind:
30 iii) das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyltransferase (*SAT1*)
und
iv) das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*),
oder
b) zunächst Plasmide konstruiert, auf denen jeweils eines der unter
a-i) genannten Gene insertiert ist,
35 und
c) mit den so hergestellten Plasmiden Mikroorganismen transformiert,
wobei die Mikroorganismen mit einem Plasmid unter a-i) bis a-vii)

- transformiert werden oder mit mehreren Plasmiden unter b) gleichzeitig oder nacheinander transformiert werden,
- d) mit den so hergestellten Mikroorganismen eine Fermentation zu Ergosterol durchführt,
- 5 e) nach erfolgter Fermentation das Ergosterol und dessen Zwischenprodukte aus den Zellen extrahiert und analysiert und schließlich
- f) das so erhaltenen Ergosterol und dessen Zwischenprodukte mittels Säulenchromatographie reinigt und isoliert.
- 10
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Plasmid unter a-ii), a-iii) und a-v) zusätzlich das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*) und auf dem Plasmid a-ii) zusätzlich das Gen der Acyl-CoA:Sterol-Acyl-transferase insertiert ist.
- 15
4. Verfahren zur Herstellung von Ergosterol und dessen Zwischenprodukten, dadurch gekennzeichnet, daß man die in Anspruch 1 unter a), die in Anspruch 2 unter a-i) bis a-vii) und die in Anspruch 3 unter a-ii), a-iii) und a-v) genannten Gene mit den Plasmiden zunächst jeweils unabhängig voneinander in Mikroorganismen gleicher Spezies einführt und mit diesen gemeinsam eine Fermentation zu Ergosterol durchführt und das so erhaltene Ergosterol aus den Zellen extrahiert, analysiert und mittels
- 20 Säulenchromatographie reinigt und isoliert.
- 25
5. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zwischenprodukte Squalen, Farnesol, Geraniol, Lanosterol, Zymosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, 4-Methylzymosterol, Ergost-7-enol und Ergosta-5,7-dienol sind.
- 30
6. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zwischenprodukte Sterole mit 5,7-Dienstruktur sind.
- 35

7. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasmide die Plasmide YEph2, YDpUHK3 und pADL-SAT1 sind.
- 5 8. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen Hefen sind.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es die Spezies
10 *S. cerevisiae* ist.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es der Stamm
15 *S. cerevisiae* AH22 ist.
11. Hefestamm *S. cerevisiae* AH22, enthaltend eines oder mehrerer der im Verfahren unter a-i) genannten Gene.
- 20 12. Plasmid YEph2, bestehend aus dem mittleren *ADH*-Promotor, t-HMG (veränderte Variante des *HMG1*) und dem *TRP*-Terminator (Fig. 1).
- 25 13. Plasmid YDpUHK3, bestehend aus dem mittleren *ADH*-Promotor, t-HMG (veränderte Variante des *HMG1*) und dem *TRP*-Terminator, dem Gen für die Kanamycin-Resistenz und dem *ura3* Gen (Fig. 2).
- 30 14. Plasmid pADL-SAT1, bestehend aus dem *SAT1*-Gen und dem *LEU2*-Gen aus YE13.
- 35 15. Verwendung der Plasmide gemäß den Ansprüchen 12 bis 14, zur Herstellung von Ergosterol.

16. Verwendung der Plasmide gemäß den Ansprüchen 12 bis 14, zur Herstellung der Ergosterol - Zwischenprodukte Squalen, Farnesol, Geraniol, Lanosterol, Zymosterol, 4,4-Dimethylzymosterol, 4-Methylzymosterol, Ergost-7-enol und Ergosta-5,7-dienol.
17. Verwendung der Plasmide gemäß den Ansprüchen 12 bis 14, zur Herstellung von Sterolen mit 5,7-Dienstruktur.
18. Expressionskassette, umfassend den mittleren *ADH*-Promotor, das *t-HMG*-Gen, den *TRP*-Terminator und das *SAT1*-Gen mit dem mittleren *ADH*-Promotor und dem *TRP*-Terminator.
19. Expressionskassetten, umfassend den mittleren *ADH*-Promotor, das *t-HMG*-Gen, den *TRP*-Terminator, das *SAT1*-Gen mit dem mittleren *ADH*-Promotor und dem *TRP*-Terminator und das *ERG9*-Gen mit dem mittleren *ADH*-Promotor und dem *TRP*-Terminator.
20. Kombination aus Expressionskassetten, wobei die Kombination aus
- a) einer ersten Expressionskassette, auf der der *ADH*-Promotor, das *t-HMG*-Gen und der *TRP*-Terminator lokalisiert ist,
 - b) einer zweiten Expressionskassette, auf der der *ADH*-Promotor, das *SAT1*-Gen und der *TRP*-Terminator lokalisiert ist,
 - und
 - c) einer dritten Expressionskassette, auf der der *ADH*-Promotor, das *ERG9*-Gen mit dem *TRP*-Terminator lokalisiert ist.
21. Verwendung der Expressionskassetten gemäß den Ansprüchen 18 bis 20, zur Transformation von Mikroorganismen, die bei der Fermentation zu Ergosterol eingesetzt werden.
22. Verwendung gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Mikroorganismus Hefe ist.

23. Mikroorganismen, enthaltend Expressionskassetten gemäß den Ansprüchen 18 bis 20.
- 5 24. Mikroorganismus gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß es Hefe ist.
- 10 25. Verwendung des Mikroorganismus gemäß den Ansprüchen 23 und 24, bei der Fermentation zu Ergosterol.
- 15 26. Verwendung des Mikroorganismus gemäß den Ansprüchen 23 und 24, bei der Fermentation zu Ergosterol-Zwischenprodukten.

5

10

15

20

25

30

35

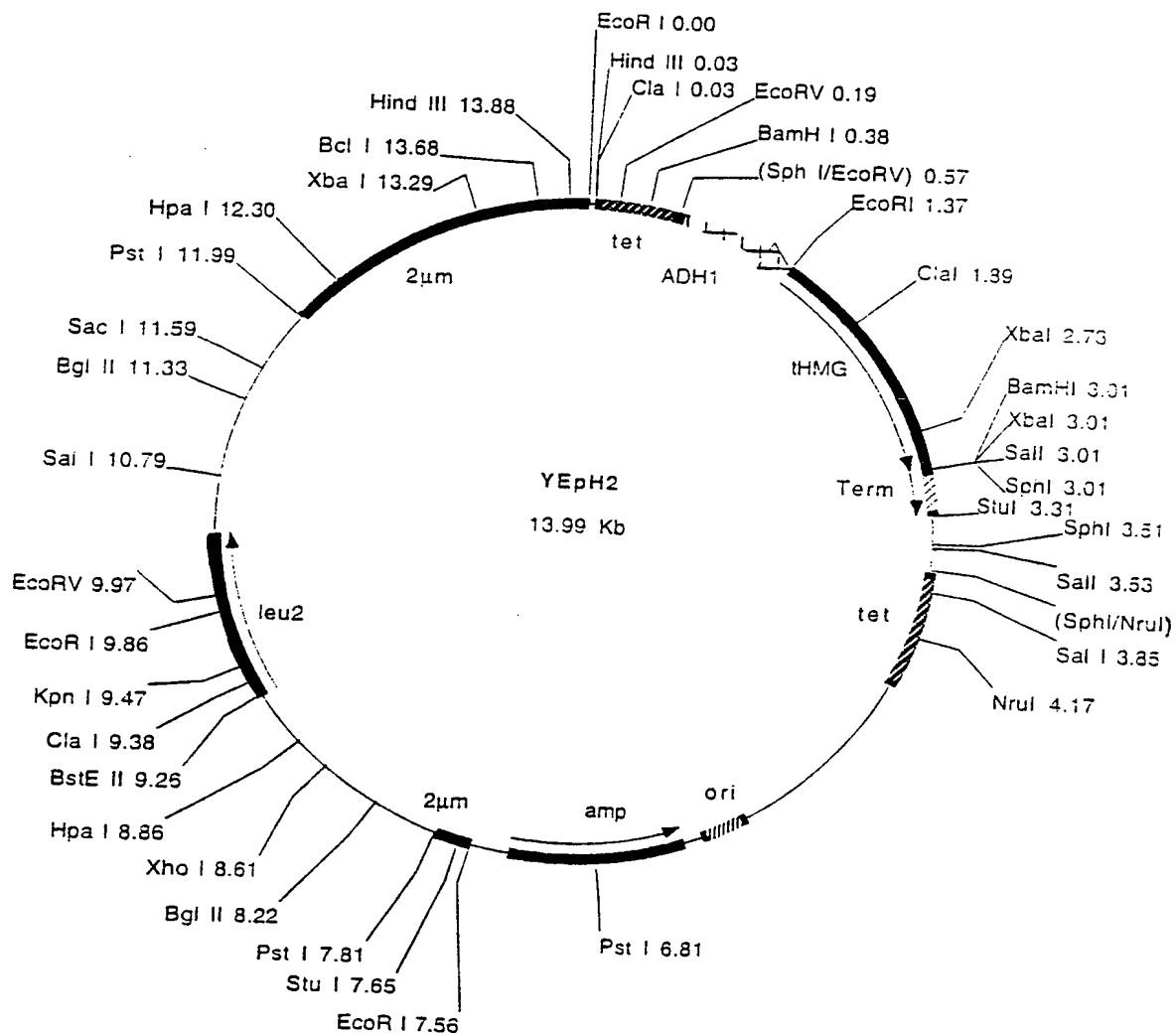


Fig. 1

5

10

15

20

25

30

35

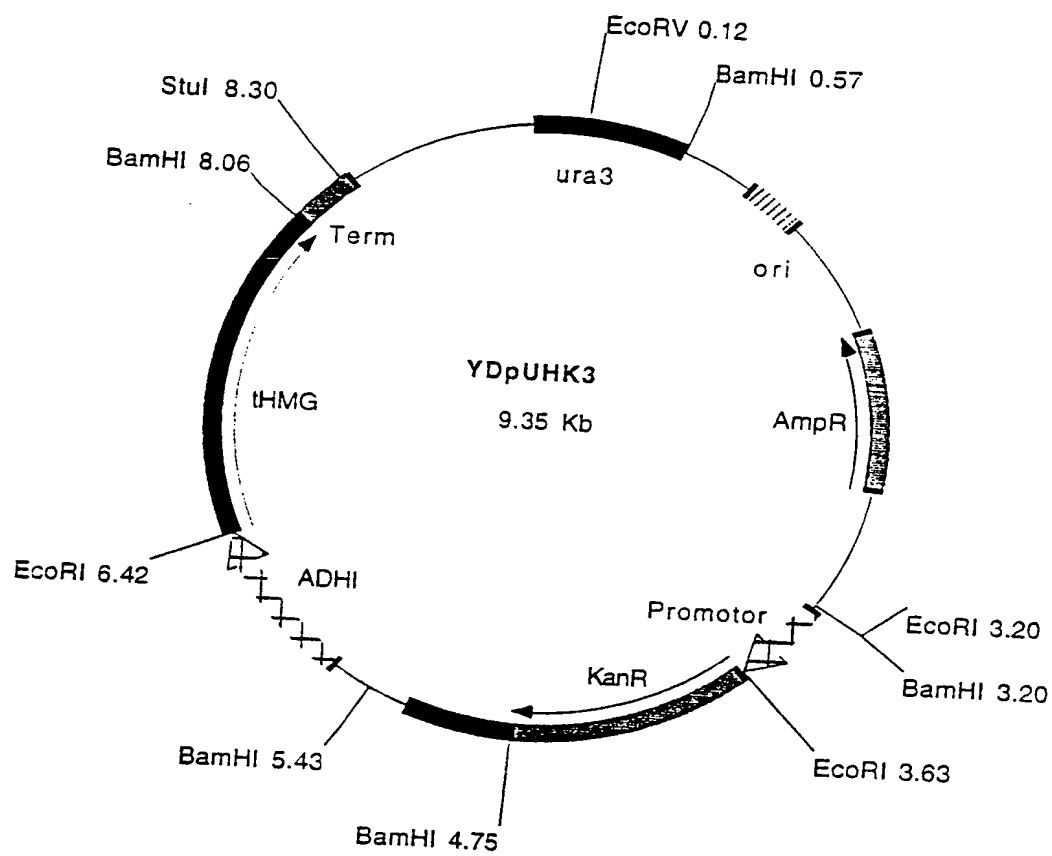


Fig. 2

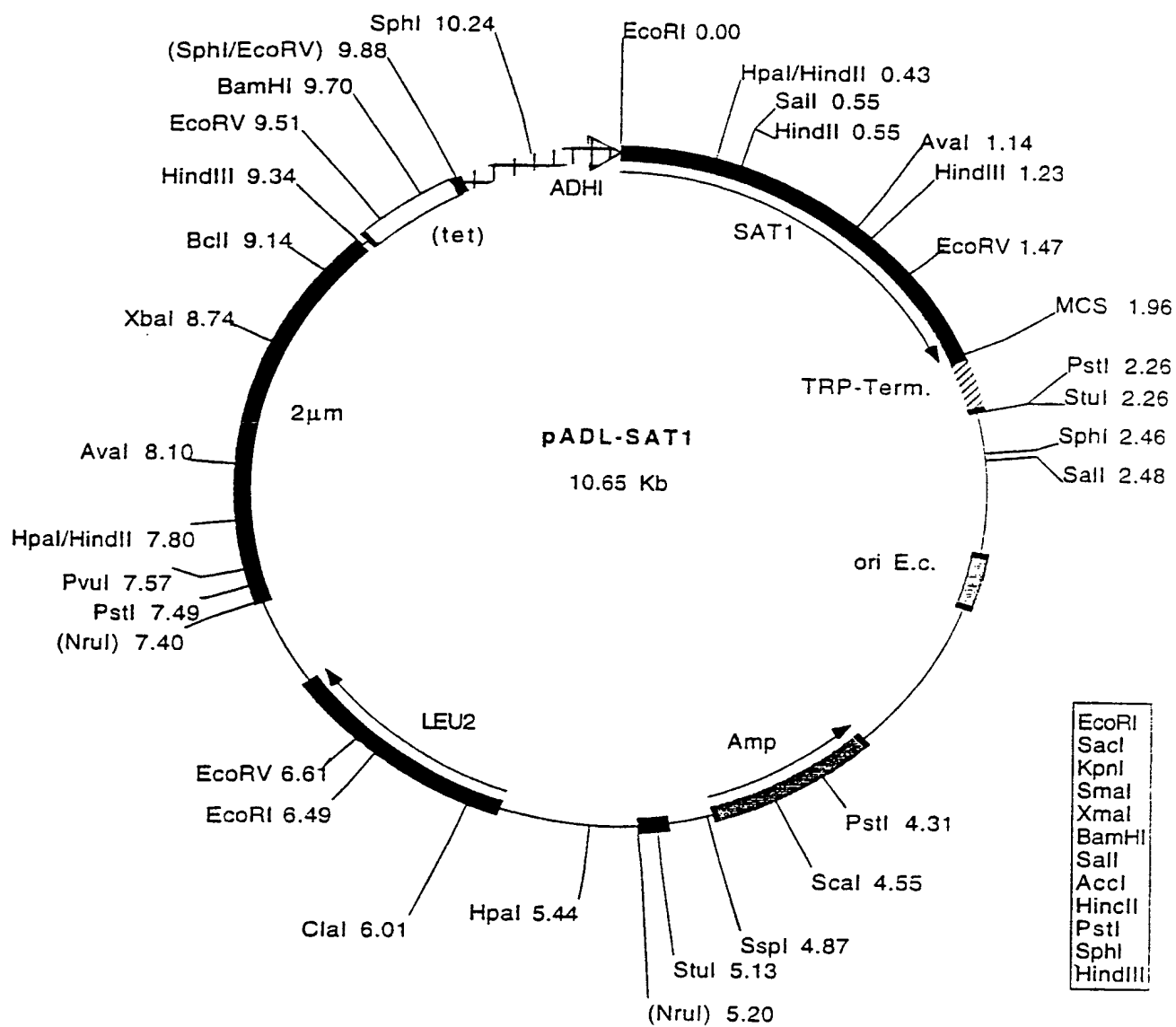


Fig. 3

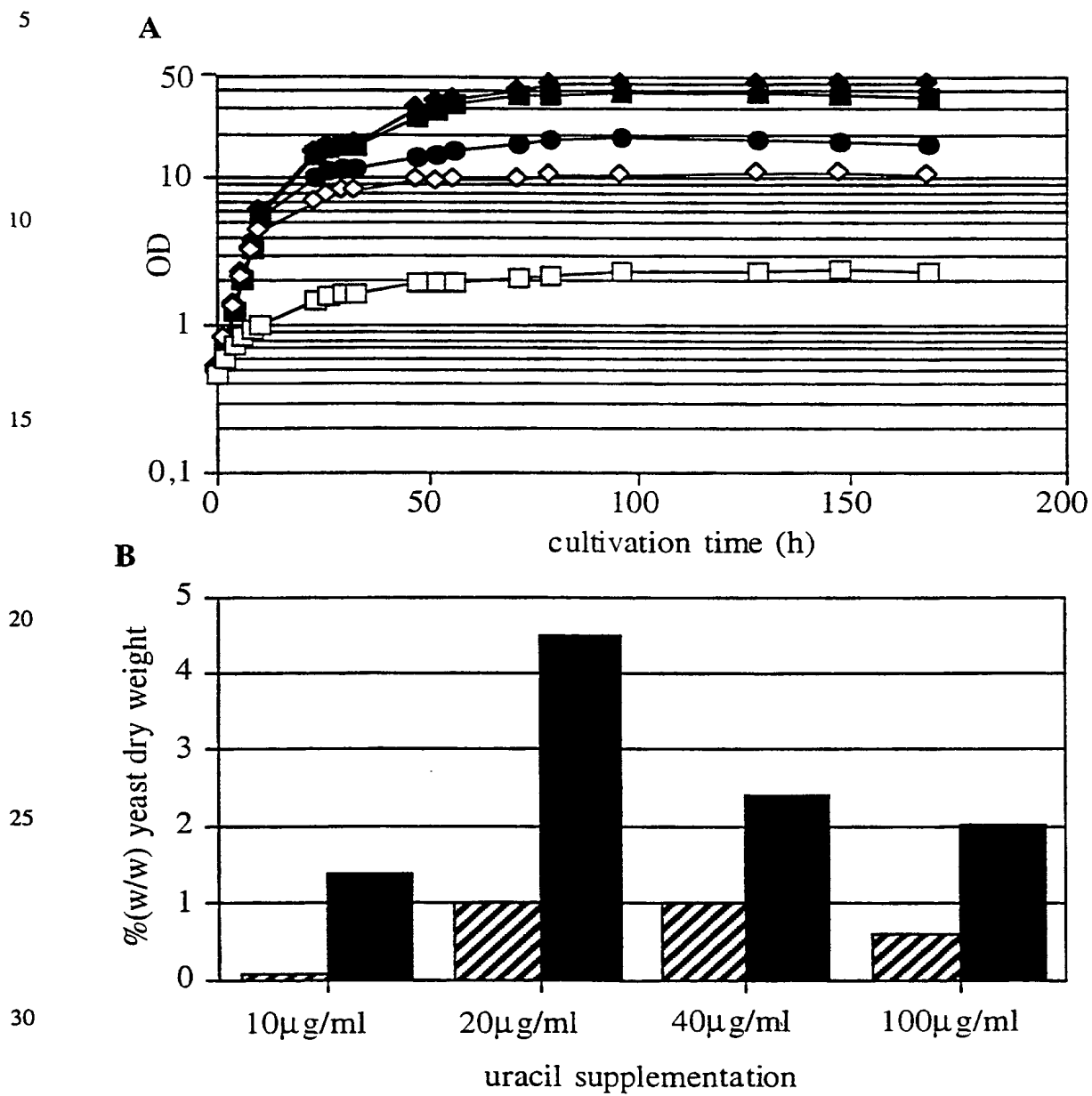


Fig. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/06134

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/52 C12N15/81 C12N1/19 C12P5/02 C12P7/04
C12P7/02 C12P33/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 486 290 A (AMOCO CORP) 20 May 1992 cited in the application see abstract ---	1-26
A	EP 0 313 465 A (PERNOD RICARD) 26 April 1989 cited in the application see abstract ---	1-26
A	V. ARIES AND B.H. KIRSOP: "Sterol Biosynthesis by strains of Saccharomyces cerevisiae in the presence and absence of dissolved oxygen" J. INST. BREWING, vol. 84, no. 2, March 1978 - April 1978, pages 118-122, XP002094330 London, UK see the whole document --- -/--	1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 February 1999

Date of mailing of the international search report

09/03/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. Application No

PCT/EP 98/06134

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>K. ALLEN ET AL.: "Effects of overproduction of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on squalene synthesis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>"</p> <p>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOL., vol. 63, no. 9, September 1997, pages 3341-3344, XP002094331</p> <p>AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, DC, US</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-26
A	<p>N.D. LEES ET AL.: "Cloning of the late genes in the ergosterol Biosynthetic pathway of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>"</p> <p>LIPIDS, vol. 30, no. 3, March 1995, pages 221-226, XP002094332</p> <p>AOCS Press, us</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-26
A	<p>M.E. BASSON ET AL.: "<i>Saccharomyces cerevisiae</i> contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase"</p> <p>PROC. NATL. ACAD. SCI., vol. 83, August 1986, pages 5563-5567, XP002094333</p> <p>NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US;</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-26
A	<p>S.M. JENNINGS ET AL.: "Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalen synthetase"</p> <p>PROC. NATL. ACAD. SCI., vol. 88, July 1991, pages 6038-6042, XP002094334</p> <p>NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US;</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-26
A	<p>A. JANDROSITZ ET AL.: "The gene encoding squalene epoxidase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>: cloning and characterization"</p> <p>GENE, vol. 107, 1991, pages 155-160, XP002094335</p> <p>ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, B.V., AMSTERDAM, NL;</p> <p>cited in the application</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/06134

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category "	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>C. YU ET AL.: "Molecular cloning and characterization of two isoforms of Saccharomyces cerevisiae Acyl-CoA:Sterol Acyltransferase"</p> <p>J. BIOL. CHEM., vol. 271, no. 39, 27 September 1996, pages 24157-24163, XP002094336</p> <p>AM. SOC. BIOCHEM. MOL.BIOL.,INC.,BALTIMORE,US cited in the application see the whole document</p> <p>-----</p>	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter. Application No

PCT/EP 98/06134

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0486290 A	20-05-1992	US 5460949 A JP 5192184 A	24-10-1995 03-08-1995
EP 0313465 A	26-04-1989	FR 2622208 A DE 3880619 A DK 589288 A ES 2054847 T IE 62461 B	28-04-1989 03-06-1993 23-04-1989 16-08-1994 08-02-1995

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06134

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/52 C12N15/81 C12N1/19 C12P5/02 C12P7/04
C12P7/02 C12P33/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 486 290 A (AMOCO CORP) 20. Mai 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung ---	1-26
A	EP 0 313 465 A (PERNOD RICARD) 26. April 1989 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung ---	1-26
A	V. ARIES AND B.H. KIRSOP: "Sterol Biosynthesis by strains of Saccharomyces cerevisiae in the presence and absence of dissolved oxygen" J. INST. BREWING, Bd. 84, Nr. 2, März 1978 - April 1978, Seiten 118-122, XP002094330 London, UK siehe das ganze Dokument ---	1-26

-/--



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung, nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Februar 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

09/03/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>K. ALLEN ET AL.: "Effects of overproduction of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on squalene synthesis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOL., Bd. 63, Nr. 9, September 1997, Seiten 3341-3344, XP002094331 AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, DC, US siehe das ganze Dokument</p>	1-26
A	<p>N.D. LEES ET AL.: "Cloning of the late genes in the ergosterol Biosynthetic pathway of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>" LIPIDS, Bd. 30, Nr. 3, März 1995, Seiten 221-226, XP002094332 AOCS Press,us siehe das ganze Dokument</p>	1-26
A	<p>M.E. BASSON ET AL.: "<i>Saccharomyces cerevisiae</i> contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase" PROC. NATL. ACAD. SCI., Bd. 83, August 1986, Seiten 5563-5567, XP002094333 NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US; siehe das ganze Dokument</p>	1-26
A	<p>S.M. JENNINGS ET AL.: "Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalen synthetase" PROC. NATL. ACAD. SCI., Bd. 88, Juli 1991, Seiten 6038-6042, XP002094334 NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US; siehe das ganze Dokument</p>	1-26
A	<p>A. JANDROSITZ ET AL.: "The gene encoding squalene epoxidase from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>: cloning and characterization" GENE, Bd. 107, 1991, Seiten 155-160, XP002094335 ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, B.V., AMSTERDAM, NL; in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p>	1-26
-/--		

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>C. YU ET AL.: "Molecular cloning and characterization of two isoforms of Saccharomyces cerevisiae Acyl-CoA:Sterol Acyltransferase"</p> <p>J. BIOL. CHEM., Bd. 271, Nr. 39, 27. September 1996, Seiten 24157-24163, XP002094336</p> <p>AM. SOC. BIOCHEM. MOL.BIOL., INC., BALTIMORE, US</p> <p>in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-26

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inter. Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06134

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0486290	A	20-05-1992	US	5460949 A	24-10-1995
			JP	5192184 A	03-08-1995
EP 0313465	A	26-04-1989	FR	2622208 A	28-04-1989
			DE	3880619 A	03-06-1993
			DK	589288 A	23-04-1989
			ES	2054847 T	16-08-1994
			IE	62461 B	08-02-1995